 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.02.23 J South Med Univ, 2015, 35(2): 268-271

基础研究

硼酸盐缓冲液制备尿酸酶复合脂质体及尿酸酶的特性

周云莉[1],杨 林[2],晏子俊[1],邓 雪[1],张景勍[1]

[1]重庆医科大学药物高校工程研究中心,重庆 400016;[2]重庆医药高等专科学校药学系,重庆 401331

摘要:目的 研究硼酸-硼砂缓冲液制备的尿酸酶-过氧化氢酶脂质体(BUCLP)中尿酸酶的体外特性。**方法** 采用逆向蒸发法制备BUCLP,并考察其部分理化性质特性。**结果** BUCLP中尿酸酶最适温度保持在40 ℃,最适pH值由8.5降为8.0,而Km值也由14.207 μmol/L降为13.623 μmol/L;尿酸酶-过氧化氢酶(UAC)与空白纳米脂质体作用后,再与FITC结合,其荧光强度高于游离UAC与FITC结合的荧光强度,且BUCLP在280 nm处的荧光强度高于游离UAC。**结论** 尿酸酶和过氧化氢酶联合制备成BUCLP后尿酸酶的活性增加。

关键词:尿酸酶;过氧化氢酶;脂质体;米氏常数;荧光图谱

Preparation and characterization of uricase in uricase-catalase liposomes prepared using borate buffer

ZHOU Yunli[1], YANG Lin[2], YAN Zijun[1], DENG Xue[1], ZHANG Jingqing[1]

[1]Medicine Engineering Research Center, Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China

Abstract: Objective To characterize the property of uricase loaded in uricase-catalase liposomes (BUCLPs) prepared using borate buffer. **Methods** BUCLPs were prepared using reverse-phase evaporation, and the physicochemical properties of uricase in the prepared BUCLPs were examined. **Results** The optimal temperature of BUCLP and URI was 40 ºC, their optimal pH values were 8.0 and 8.5, and their Michaelis-Menten constants were 14.207 μmol/L and 13.623 μmol/L, respectively. Fluorescence intensity of nanoliposome-loaded uricase-catalase that bound to FITC was higher than that of uricase-catalase binding directly with FITC; the fluorescence intensity of BUCLP was higher than that of free uricase-catalase at 280 nm. **Conclusion** Uricase activity is enhanced after loading in uricase and catalase liposomes.

Key words: uricase; catalase; liposomes; michaelis-menten constand; fluorescence spectrum

尿酸酶(uricase, URI)是生物体内嘌呤代谢途径中的关键酶,可以专一性催化氧化尿酸生成尿囊素、过氧化氢等[1]。但由于人体缺乏尿酸酶,只能将尿酸作为终产物由肾脏排出体外。血液中过量积累尿酸会导致痛风、高尿酸血症等高尿酸综合症状[2]。在临床上目前治疗高尿酸血症的药物屈指可数。尿酸酶在降尿酸水平时,产生的过氧化氢有细胞毒性[3]。而过氧化氢酶(catalase, CAT)可降解H_2O_2。王娜等[4]研究尿酸酶脂质纳米粒,陈炎等[5]研制了过氧化氢酶固体脂质纳米粒,Yoshimoto等[6]研究了葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶复合脂质体,而本实验联合尿酸酶和过氧化氢酶制备的脂质体(uricase and catalase liposomes, BUCLP),目前尚未见报道。将URI制备成BUCLP后,最希望得到的结果是提高URI降尿酸能力的同时降低过氧化氢的副作用,URI和CAT同时发挥作用。BUCLP的体内实验在其他文章中有报道,本文主要研究BUCLP的体外性质。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

产朊假丝酵母尿酸酶、牛肝过氧化氢酶、异硫氰酸荧光素均购自美国Sigma-Aldrich公司;尿酸购自英国Alfa Aesar公司;大豆卵磷脂购自德国Lucas Meyer公司;胆固醇(广州天马精细化工厂);其余试剂均购自重庆川东化工集团有限公司

1.2 仪器设备

RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D Ⅲ循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);UV-7504 PC紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);F-2500荧光光度计(日本Hitachi公司);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)

1.3 BUCLP的制备

本文采用逆向蒸发法制备尿酸酶-过氧化氢酶脂质体[7]。称取卵磷脂和胆固醇(摩尔比1∶1)溶于氯仿中,然后在旋转蒸发仪上挥干氯仿,在瓶壁上形成均匀的脂

收稿日期:2014-10-26
基金项目:国家自然科学基金(30973645)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30973645).
作者简介:周云莉,硕士研究生,E-mail: zhouyunli716@163.com
通信作者:张景勍,教授,博士生导师,E-mail: zjqrae01@163.com

质膜，将脂质膜复溶于乙醚，并加入含尿酸酶和过氧化氢酶的50 mmol/L硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.5)，在水浴型超声仪上超声至形成均匀分散体系。除去此体系中的有机溶剂，最后形成均匀的乳白色混悬液，经0.22 μm滤膜过滤，即得BUCLP。

1.4 酶活性的测定

URI活性单位的定义：每1 min催化1 μmol底物尿酸转化为产物所需的URI的量。具体方法按照参考文献[8-9]操作，将20 μl游离URI和BUCLP经过破乳后的上清液，分别加入到pH 8.5的硼酸-硼砂缓冲液溶解的75 μmol/L尿酸溶液中，然后在25 ℃测定1 min内在293 nm处吸光度的变化值。

1.5 最适温度的测定

将75 μmol/L尿酸溶液分别在20、30、40、50、60和70 ℃水浴中预热10 min后，在25 ℃时，分别测定URI和BUCLP中URI的活性。

1.6 最适pH的测定

将pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5的尿酸溶液在酶的最适温度条件下预热10 min后，测定URI的活性。

1.7 米氏常数(Km)的测定

在酶的最适条件下，以50、40、30、20和10 μmol/L尿酸溶液为底物，按照酶活性测定方法，测定不同浓度的尿酸在293 nm波长处吸光度的变化。计算反应速度V，根据Lineweaver-Burk双倒数作图，再计算URI和BUCLP的Km值。

1.8 UAC与脂质体膜作用的实验

分别取URI和CAT的混合液(UAC)和空白脂质体与pH 8.5的硼酸-硼砂溶解的异硫氰酸荧光素(FITC)溶液混合后，避光孵化5 min。在激发波长为480 nm，发射波长500~600 nm的条件下，25 ℃恒温扫描其荧光发射图谱。

将URI和CAT的混合液(UAC)与空白脂质体混合均匀，在室温下孵化1 h。取此混悬液与FITC溶液混合，然后在黑暗处孵化5 min。在激发波长为480 nm，25 ℃恒温扫描其在发射波长500~600 nm的荧光发射图谱。

1.9 URI的构效关系荧光图谱

取游离URI、UAC、BUCLP经破乳后的上清液，其中URI的浓度均为0.1 mg/ml，然后将UAC稀释6倍，BUCLP经破乳后的上清液稀释600倍，在激发波长为280 nm，发射波长为200~400 nm条件下，25 ℃恒温扫描其荧光发射图谱。

2 结果

2.1 最适温度和最适pH

BUCLP中URI和游离URI的最适温度均为40 ℃，且从20 ℃到60 ℃，BUCLP中URI的活性均比游离URI高(图1)。

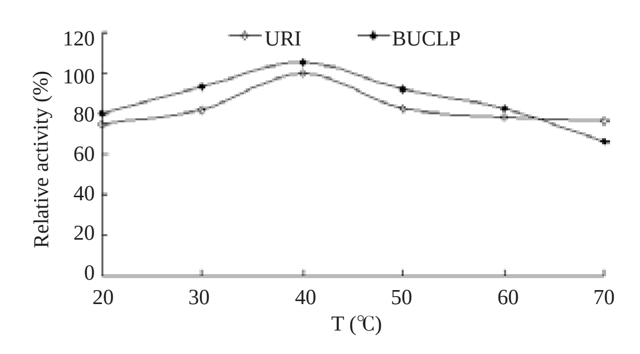


图1 URI和BUCLP的最适温度
Fig.1 Optimal temperature of URI and BUCLP.

BUCLP中URI和游离URI的最适pH值分别为8.0和8.5，从pH 6.5到8.0，BUCLP中URI的活性较游离URI的活性高，而从pH 8.5到9.5时，URI的活性较BUCLP中URI的活性高(图2)。

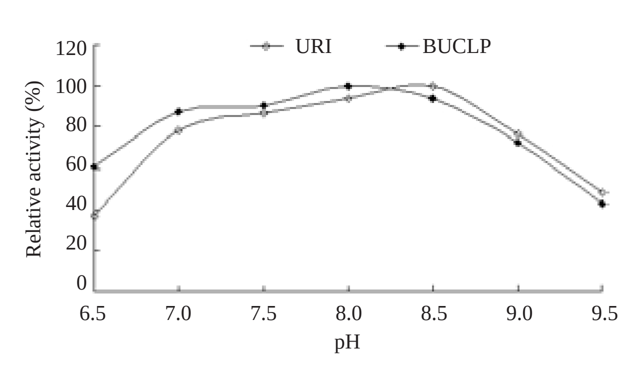


图2 URI和BUCLP的最适pH
Fig.2 Optimal pH of URI and BUCLP.

2.2 Km值

BUCLP中URI的米氏方程为：y=1.3269x+0.0974，V_{max}为10.267 μmol/L·min，K_{max}为13.623 μmol/L；而游离URI的米氏方程为：y=1.2186x+0.0861，V_{max}为11.641 μmol/L·min，K_{max}为14.207 μmol/L。BUCLP的K_{max}比URI的小，那么，BUCLP中URI与底物尿酸的亲和力比URI大(图3)。

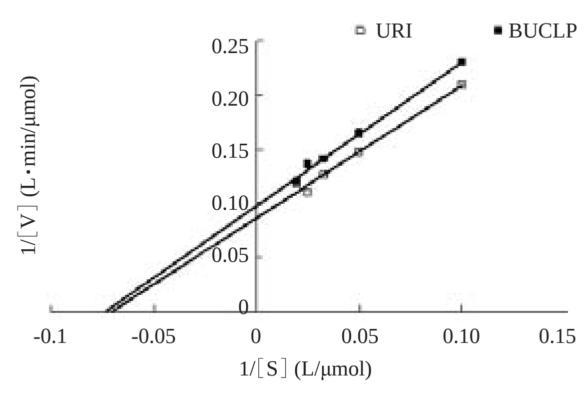


图3 URI和BUCLP的米氏常数测定曲线
Fig.3 Lineweaver-Burk plot of URI and BUCLP.

2.3 URI与脂质体膜作用实验结果

空白脂质体与FITC结合后的荧光强度最低，其次是空白脂质体与游离UAC的混合液，而游离UAC与FITC结合后的荧光强度最高(图4)。理论上全部的UAC与FITC结合后的荧光强度应最强，但是有一部分UAC与空白脂质体结合，所以与FITC结合的UAC相应减少，继而荧光强度减弱。说明UAC与空白脂质体之间有结合作用。

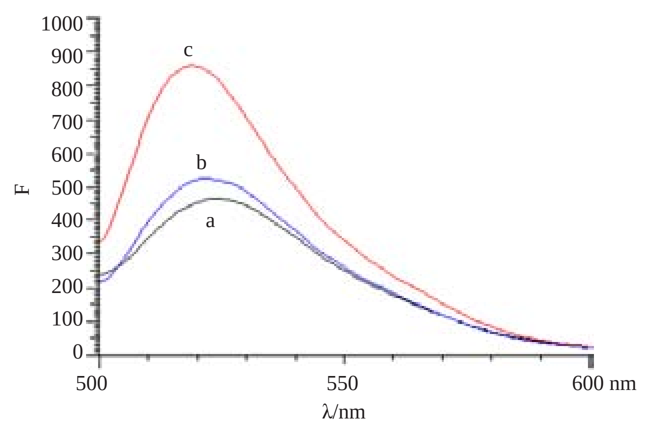


图4 FITC与酶结合的荧光图谱

Fig.4 Fluorescence spectrum of FITC combined with enzyme. a: Blank liposomes; b: Blank liposomes and free UAC; c: Free UAC.

2.4 URI的构效荧光图谱

BUCLP在280 nm处的荧光强度最大，游离URI的荧光强度最小，而URI和CAT混合液此时的荧光强度介于两只之间(图5)。

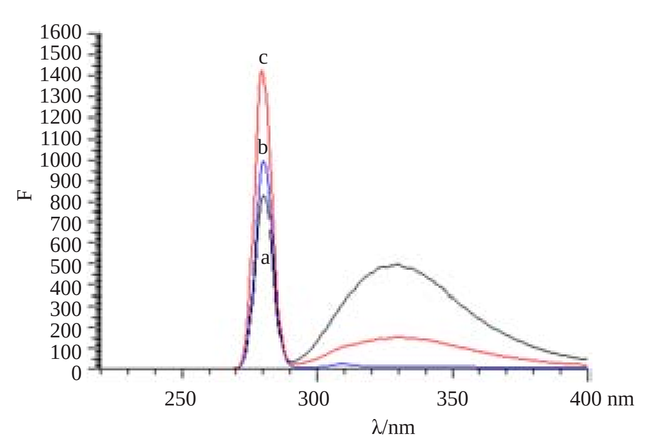


图5 URI和BUCLP在280 nm的荧光强度

Fig.5 Fluorescence intensity of URI and BUCLP at 280 nm. a: Free URI; b: Free UAC; c: BUCLP.

3 讨论

本实验中URI和BUCLP中URI的最适温度均较为接近人体的生理体温37 ℃；且较游离URI的最适pH，BUCLP中URI的最适pH更为接近人体血浆的pH值。在URI的最适温度和最适pH时，BUCLP中URI的活性比游离URI高。酶的理化性质及稳定性与温度和pH密切相关。酶在其最适温度和最适pH时，活性最高，酶促反应速度最快。说明BUCLP较游离URI更能有效发挥酶促反应。但是最适pH发生变化的可能是BUCLP中URI受CAT或者脂质体的影响，使URI的构象等发生变化，活性中心暴露，最后导致URI的最适pH和活性发生变化。

从Km测定结果看，BUCLP中URI与尿酸的亲和力比游离URI大。而Km值是酶的特征性常数，只与酶的性质、酶所催化的底物和酶促反应条件(如温度、pH、有无抑制剂等)有关。本实验有可能是BUCLP中URI的最适pH发生变化，导致Km发生变化。

本实验利用FITC能与蛋白质中氨基酸(主要是赖氨酸)结合的原理[9]，将FITC与URI和CAT结合，从而使URI和CAT带有一定的荧光。通过荧光强度发生变化来考察URI和CAT能否与脂质体膜作用。最后结果表明，URI和CAT能脂质膜内外结合。

因为酪氨酸在280 nm处有特征的荧光吸收峰[10]，含酪氨酸的蛋白质类物质在280 nm均有特征吸收峰。所以URI和CAT均在280 nm有特征吸收峰。但是可能是过氧化氢酶中含有的酪氨酸残基比尿酸酶的多，导致CAT在280 nm处的荧光强很大。所以本实验将UCA和CAT混合液稀释6倍后，测定其荧光强度，仍比UCA大。而BUCLP的上清液稀释了600倍，其在280 nm处的荧光强度仍比UCA大。也可能是由于在URI制备成BUCLP后，URI受到CAT或者脂质体膜的作用，其构象发生变化，导致其荧光强度发生变化。但是具体是哪种情况导致荧光强度发生变化的原因还需要深一步进行实验。

因此，尿酸酶与过氧化氢酶制备成脂质体后增加了尿酸酶的体外活性，为进一步研究尿酸酶和过氧化氢酶复合脂质体的体内实验奠定了基础。

参考文献：

[1] Krishnan E, Kwoh CK, Schumacher HR, et al. Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome [J]. Hypertension, 2007, 49(2): 298-303.

[2] Sakai H, Tsutamoto T, Tsutsui T, et al. Sermn level of uric acid, partly secreted from the failing heart is a prognostic marker in patients with congestive hean failure [J]. Circ J, 2006, 70(1): 1006-11.

[3] Roddy E, Doherty M. Treatment of hyperuricaemia and gout [J]. Clin Med (Northfield Il), 2013, 13(4): 400-3.

[4] 王 娜, 赵春景, 黄开顺, 等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(8): 1147-50.

[5] 陈 焱, 黄健花, 蔡春明, 等. 过氧化氢酶固体脂质纳米粒的制备[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(4): 489-94.

[6] Yoshimoto M, Miyazaki Y, Kudo Y, et al. Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes[J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(3): 704-9.
[7] Tan QY, Zhang JQ, Wang N, et al. Improved biological properties and hypouricemic effects of uricase from Candida utilis loaded in novel alkaline enzymosomes[J]. Int J Nanomed, 2012, 7: 3929-38.
[8] Tan QY, Zhang JL, Wang N, et al. Uricase from Bacillus fastidious loaded in alkaline enzymosomes: Enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 82(1): 43-8.
[9] Tan QY, Wang N, Yang H, et al. Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles[J]. Int J Pharm, 2010, 384 (1/2): 165-72.
[10] Qiu YZ, Huang ZH, Song FJ. Enzymatic activity enhancement of Non-Covalent modified superoxide dismutase and molecular docking analysis[J]. Molecules, 2012, 17(4): 3945-56.

（编辑：黄开颜）